

Sendai-Virus-induzierte Fusion von Tumorzellen
mit Mausfibroblasten:
Malignitätsanalyse der Hybridzellen in vitro und in vivo.

MONIKA VETTERLEIN

1974

Aus dem Institut für Krebsforschung der Universität Wien

Vorstand: Prof. Dr. Dr. H. Wrba

vorgelegt über das Institut für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. E. Dahme

Sendai-Virus-induzierte Fusion von Tumorzellen mit Mausfibroblasten:

Malignitätsanalyse der Hybridzellen in vitro und in vivo.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

von

MONIKA VETTERLEIN

aus

HAMBURG

MÜNCHEN 1973

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. DAHME

Referent: Prof. Dr. Dr. H. WRBA

Koreferent: Prof. Dr. E. DAHME

Tag der Promotion: 22. 2. 1974

Das hier beschriebene Verfahren ist ein Patent der Universität München.

Erstellt am 10. April 1973

Das hier beschriebene Verfahren ist ein Patent der Universität München.

Erstellt am 10. April 1973

Sonder-Virus-induzierte Fusion von Tumorzellen

mit Molekularbiologie

Malignitätsanalyse der Hybridzellen in vitro und in vivo

INSTITUT FÜR ZELLULÄRE PHYSIOLOGIE

ZUM ERGÄNZEN DER THEORETISCHEN BILDUNGSWEISE

DER THEORETISCHEN TUMORFORSCHUNG

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

1973

MONIKA VETTERLIN

1973

HAMBURG

MÜNCHEN 1973



Rechnung der Universität der Niederlande, Leiden, 1973

1973, 10. April

1973, 10. April

1973, 10. April

1973, 10. April

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	5
1. Geschichte der Fusion von Somazellen	7
1.1 Mechanismus der Fusion von Somazellen	7
1.2 Problemstellung	8
2. Material und Methode	8
2.1 Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen	8
2.1.1 Wachstum in vivo	8
2.1.2 Karyotyp, Markerchromosomen, Histogramm von Chromosomenzählungen	7, Abb. 1
2.2 Mausfibroblasten	8
2.2.1 Wachstum in vitro und in vivo	8
2.2.2 Karyotyp, Markerchromosomen, Histogramm von Chromosomenzählungen	8, Abb. 2
3. Sendai-Virus	8
3.1 Virusvermehrung	8
4.1 Technik der Fusion von Somazellen	9
4.2 Selektion der Hybridzellen	9
4.3 Chromosomenpräparation	9
5. Ergebnisse	10
5.1 Morphologie und Wachstum der Hybridzellen in vitro	10
5.1.1 Karyotyp, Markerchromosomen, Histogramm von Chromosomenzählungen	10, Abb. 3
5.2 Überimpfen der Hybridzellen auf histokompatible Mäuse	10
5.2.1 Tumorangehrate	11
6. Diskussion	11
6.1 Suppression der Malignität der Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen, solange die Genotypen beider Elternzellen annähernd vollständig in der Hybridzelle vorliegen. Selektion in Richtung Malignität nach Chromosomenverlust	11
7. Literaturverzeichnis	14
Lebenslauf	15

Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUSAMMENFASSUNG

Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen und A-9-Mausfibroblasten wurden mittels inaktiviertem Sendai-Virus fusioniert. In den daraus resultierenden Hybridzellen konnten ungefähr die Summe der Chromosomen beider Elternzellen und ihre spezifischen Markerchromosomen gefunden werden.

Nach unterschiedlich langer Züchtung dieser Zellen in vitro wurde ihre Malignität durch Überimpfen auf histokompatible Mäuse getestet.

Dabei hat sich gezeigt, daß, solange beide Chromosomensätze in der Hybridzelle vorhanden waren, keine Tumoren in den Mäusen auftraten. Nachdem aber diese Zellen ein Jahr lang in Kultur gezüchtet worden waren und Chromosomen abgestoßen worden waren, konnten in den überimpften Tieren in 16,6% Hybridzellproliferationen festgestellt werden.

In Chromosomenanalysen hat sich gezeigt, daß diese in vivo gewachsenen Hybridzellen in einem Drittel der Zellen eine stark reduzierte Chromosomenzahl aufwiesen.

Daraus kann geschlossen werden, daß in vivo eine Selektion in Richtung Malignität stattfindet.

SUMMARY

Ehrlich-Lettré ascitic tumor cells and A-9 mouse fibroblasts were fused together by means of inactivated Sendai virus. In the resulting hybrid cells approximately the sum of both sets of chromosomes and their specific marker-chromosomes were found.

In testing the malignancy of these hybrid cells after different periods of propagation in vitro in histocompatible mice, it turned out, that as long as both sets of chromosomes were present in the hybrid cell, no tumors were produced in the animals.

After one year in culture, when chromosome loss has occurred, the hybrid cells were again injected in animals.

This time hybrid cell proliferations were observed in 16,6% of the treated animals.

Chromosome analysis of the tumor cells revealed, that about 1/3 of the tumor cells showed a highly reduced chromosome number, so that one can presume, that there is a selection towards malignancy in vivo.

1. Geschichte der Fusion von Somazellen

Mehrkernige Zellen sind zuerst von MÜLLER, J. 1838 in Geschwülsten beschrieben worden. ROBIN, C. beobachtete solche Zellen im Knochenmark 1849, ROKOTANSKY in tuberkulösem Gewebe 1855 und VIRCHOW in verschiedenen normalen, entzündlichen und neoplastischen Geweben 1858. Zu dieser Zeit schrieb LANGHANS seine klassische Arbeit über mehrkernige Zellen in vivo.

Die Idee, daß solche mehrkernige Zellen aus der Fusion einkerniger Zellen entstehen könnten, stammt von DE BARY 1859. LANGE beschrieb 1875 solch einen Prozeß erstmalig von Wirbeltierzellen.

Es ist anzunehmen, daß vielkernige Zellen, die im letzten Jahrhundert in entzündlichen Prozessen beobachtet wurden, durch Viren verursacht wurden, obwohl die Virusgenese dieser Erkrankungen noch nicht nachgewiesen war. Nachweislich durch Viren entstandene mehrkernige Zellen wurden von LUGINBÜHL und WEIGERT an der Peripherie von Pockenpusteln beschrieben.

UNNA beobachtete 1896 mehrkernige Zellen in den Hautläsionen von Hühnerpocken und WARTHIN 1931 in den Tonsillen von Patienten, die an Masern erkrankt waren. Nach der Einführung der Zell- und Gewebezucht in die Zellforschung durch HARRISON wurden auch bald zahlreiche Beobachtungen von mehrkernigen Zellen in vitro gemacht. LAMBERT berichtet 1912 als erster über solche Beobachtungen. Im Jahre 1927 konnte LEWIS 21 solche Befunde zusammenstellen.

ENDERS und PEEBLES untersuchten den Effekt von Masernviren (1954) auf Zellkulturen. Diese Autoren fanden heraus, daß das Virus eine Fusion von mehreren Zellen verursacht und so zu vielkernigen Synzytien führt.

In der Folgezeit wurden zahlreiche ähnliche Beobachtungen mit verschiedenen Viren gemacht.

OKADA zeigte 1958, daß tierische Tumorzellen in Suspension leicht mit hohen Konzentrationen von HVJ-Virus (hemagglutinating Virus of Japan) angeregt werden können, miteinander zu fusionieren.

Nun stellte sich die Frage, ob solche mehrkernige Zellen fähig sind, sich zu teilen und zu vermehren.

MACCLIN hatte schon 1916 beobachtet, daß zweikernige Hühnerembryozellen in vitro in Mitose gehen können und daß solch eine Mitose manchmal zu zwei einkernigen Tochterzellen führt. Er beschrieb, wie in solch einem Fall die Chromosomen von beiden Kernen sich um eine gemeinsame Äquatorialplatte anordnen und dann wie bei einer normalen Mitose auf zwei Zellen verteilt werden.

Diese Beobachtungen konnten 1960 von BARSKI, SORIEUL und CORNEFERT bestätigt werden. Sie berichten von Chromosomenanalysen, die bestätigen, daß solche Zellen tatsächlich aus der Verschmelzung zweier verschiedener Zellen entstanden sein mußten.

1965 gelang dann HARRIS, H. und J. F. WATKINS die Fusion von Zellen verschiedener Spezies (Mensch – Maus) mittels inaktiviertem Sendai-Virus und es zeigte sich, daß auch diese Hybridzellen lebensfähig waren.

1.1 Mechanismus der Fusion von Somazellen

Der Mechanismus einer Fusion von Somazellen ist leichtverständlich, wenn man sich das normale Eindringen von Viren in Zellen vergegenwärtigt.

Dabei kommt es zunächst zu einer Adsorption des Virus an die Zellmembran. Darauf folgt eine Fusion von Virushülle und Zellmembran.

Kommt nun ein Virus zwischen zwei benachbarte Zellen zu liegen, so kann es an beide Zellen adsorbiert werden und mit den Zellmembranen fusionieren.

Auf diese Weise werden die beiden Zellen über eine Virusbrücke mit nachfolgendem Zusammenfließen der Zellplasma zu einer Zelle verschmolzen. Das Produkt dieses Vorganges ist zunächst eine Zelle mit zwei Kernen, die homokaryotisch ist, wenn gleichartige Zellen fusioniert werden oder heterokaryotisch, wenn verschiedene Zellen miteinander verschmolzen werden.

Voraussetzung für die genetische Verschmelzung zweier Zellen ist aber die Fusion ihrer Kerne. Das geschieht nun ohne weitere Einwirkung von außen, und zwar dann, wenn solch eine zweikernige Zelle in Mitose geht. Dabei lösen sich die Kernmembranen auf, die Chromosomen formieren sich auf die bekannte Weise und ordnen sich um eine gemeinsame Äquatorialplatte an. Da offensichtlich auch Chromosomenspindeln fusionieren, werden in der Anaphase die jeweils homologen Chromosomen an die Zellpole gezogen. Nach beendeter Teilung des Zellleibes resultieren zwei einkernige Tochterzellen, in denen das genetische Material beider Elternzellen vorliegt.

Da es sich bei diesem Vorgang nicht um Endemitosen handelt, geht aus der Chromosomenanalyse hervor. Dabei ist es nun sehr von Vorteil, wenn die beiden Elternzellen durch spezifische Markerchromosomen gekennzeichnet sind. Als Ergebnis der Analyse würde man die Summe der Chromosomen der Elternzellen und ihre spezifischen Markerchromosomen in der Hybridzelle erwarten.

Dabei hat sich gezeigt, daß man zwar meistens die Markerchromosomen findet, aber nur annähernd die komplette Anzahl der beiden Chromosomensätze.

Im Laufe der Vermehrung solcher Hybridzellen in vitro mit regelmäßigen Chromosomenpräparationen hat man beobachtet, daß manche Hybridzellen langsam aber stetig Chromosomen verlieren.

1.2 Problemstellung:

Um den Einfluß zweier verschiedener Genotypen in einer Hybridzelle studieren zu können, muß man solche Zellen fusionieren, die sich in ihrem Phänotyp auf ganz charakteristische Weise unterscheiden.

Da bietet sich nun an, Zellen, die sich durch eine sehr hohe Malignität auszeichnen, mit solchen zu fusionieren, die keine oder nur eine sehr geringe Proliferationsfähigkeit in vivo zeigen.

Die vorliegende Arbeit berichtet über solche Untersuchungen und es sollte festgestellt werden, ob durch die genotypische Verschmelzung einer nicht malignen mit einer hochmalignen Zelle eine phänotypische Änderung der Malignität in den Hybridzellen beobachtet werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Ehrlich-Tumorzellen wurden um die Jahrhundertwende in Dr. Ehrlichs Labor aus einem Mammacarcinom einer Maus unbekannten Genotyps isoliert.

Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen wurden seit 1932 in verschiedenen Instituten weitergezüchtet. Diese Zellen wachsen in jedem Mäusestamm und führen innerhalb von 3–6 Wochen zu letalen Neoplasmen. Selbst einzelne Zellen in Mäuse injiziert führen zu einem Tumor.

2.1.2 Chromosomenanalysen zeigen, daß diese Zellen einen nahezu diploiden Chromosomensatz haben. Im Mittel findet man 44 Chromosomen, die Streuung beträgt 39–48. Die Chromosomen sind außer einem metazentrischen alle akrozentrisch. Eines der akrozentrischen Chromosomen zeichnet sich durch eine besondere Morphologie aus. Dieses Markerchromosom kann zur Identifikation der Zellen dienen (Abb. 1). Unter Kulturbedingungen heften sich diese Zellen kaum an den Gefäßboden an.

2.2 Mausfibroblasten

2.2.1 Aus Fibroblasten einer C₃H-Maus ist eine Zelllinie etabliert worden, die sogenannte L-Zelllinie. Diese virus-transformierten Zellen können sich in vitro unbegrenzt vermehren. L-Zellen wachsen als Monolayer auf dem Boden von Glas- oder Plastikgefäßen in Eagle's Medium, Dulbecco's Modifikation, angereichert mit 10% fötalem Rinderserum. Durch Behandlung solcher L-Zellkulturen mit 3 µg 8-Azaguanin pro Milliliter Medium kann man solche Zellen selektieren, die resistent gegen diese Substanz sind. Diesen sogenannten A-9-Zellen fehlt das Enzym Inosinsäurepyrophosphorylase, was zum Absterben der Zellen führt, wenn die de-novo-Synthese von Purinen durch Aminopterin blockiert wird.

2.2.1 In vivo zeigen diese Zellen eine sehr begrenzte Wachstumsfähigkeit. Selbst hohe Dosen von diesen Zellen in C₃H-Mäuse injiziert, führen nur ganz selten zu Tumoren.

2.2.2 Der Karyotyp dieser A-9-Zellen enthält im Mittel 58 Chromosomen, die Streuung beträgt 54–63. Durchschnittlich 24 Chromosomen sind metazentrisch, alle anderen akrozentrisch. Die metazentrischen Chromosomen können in diesem Falle als Markerchromosomen dienen, da die Ehrlichzellen nur ein metazentrisches Chromosom besitzen (Abb. 2). A-9-Zellen verhalten sich in vitro und in vivo wie die L-Zellen.

3. Sendai-Virus

Das Sendai-Virus, ein RNA-Virus, gehört zur Parainfluenza Gruppe I der Myxoviren. Dieses pleomorphe Virus ist von einer Lipoproteinhülle umgeben. Die Fähigkeit, Zellen zu verschmelzen, ist in der Virushülle lokalisiert, nicht in der Nukleinsäure. Daher kann die Nukleinsäure durch UV-Licht oder mittels β -Propionolakton inaktiviert bzw. zerstört werden, ohne die Fusionskapazität wesentlich herabzusetzen. Für die Fusion von Somazellen hat sich dieses Virus am besten bewährt.

3.1 Virusvermehrung

Infizierte Allantoisflüssigkeit mit einem Titer von 8000 hämagglutinierenden Einheiten pro Milliliter wird 1 : 10000 in phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt. Von dieser Verdünnung wird 0,1 ml in die Allantoishöhle von 10 Tage

alten befruchteten Hühnereiern injiziert. Diese werden 3 Tage bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgt eine 24stündige Inkubation bei 4° C. Dann wird die Allantoisflüssigkeit gesammelt und 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. Der Überstand wird nun dekantiert und erneut bei 30.000 g 30 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird abgesaugt und verworfen. Der Niederschlag wird nun in einer kleineren Menge Pufferlösung aufgenommen und der Hämagglutinationstiter erneut bestimmt.

Die kleinste Virusmenge, die 2×10^7 Meerschweinchenerythrozyten vollständig agglutiniert, wurde als eine hämagglutinierende Einheit (HAU) definiert.

Die Virussuspension wird in Ampullen abgefüllt und bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Vor der Verwendung wird die Virussuspension mittels β -Propionolacton inaktiviert, um Interferenzen des infektiösen Virus mit den Zellen zu vermeiden. Wie schon oben beschrieben, ist für die Verschmelzung der Zellen nur die Virus-hülle notwendig.

4.1 Technik der Fusion von Somazellen

Vom Monolayer mittels einer 0,2%igen Trypsinlösung abgelöste A-9-Zellen werden in einer Dichte von 2×10^3 Zellen pro cm^2 Kulturgefäßfläche in einer adäquaten Menge Medium ausgesät und 48 Stunden bei 37° C inkubiert, damit sich die Zellen ausbreiten und anheften können.

Dann wird das Medium abgenommen und die Zellen mit kalter phosphatgepufferter isotonischer Salzlösung gewaschen. Nun gibt man die inaktivierte Virussuspension (2000 HAU/ml) zu und inkubiert 20 min bei 4° C zur Adsorption der Viren an die Zellen. Danach wird der Überstand mit nicht adsorbiertem Virus abgenommen und Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen, die kurz zuvor aus der Bauchhöhle einer Maus gewonnen worden waren und mit kalter isotonischer Salzlösung gewaschen worden waren, in einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro Milliliter auf die A-9-Zellen, an die zuvor das Virus adsorbiert wurde, gegeben. Diese Mischkultur wird 20 min bei 4° C zur Adsorption der Viren an die Zellen inkubiert.

Dann wird die Kultur weitere 20 min bei 37° C gehalten. Hier erfolgt nun die Verschmelzung zweier oder mehrerer Zellen über eine Virusbrücke und nachfolgendem Zusammenfließen der Zellplasmen.

Anschließend wird Nährmedium zugegeben und die Kultur 24 Stunden bei 37° C inkubiert.

4.2 Selektion der Hybridzellen

Da nicht alle Zellen fusionieren, liegen nun nach Beendigung des Fusionsvorganges verschiedene Zellarten in einem Kulturgefäß vor. Die beiden Elternzellen, Ehrlich-Tumorzellen und A-9-Zellen, sowie mehrkernige Zellen, die entweder homokaryotisch oder heterokaryotisch sind.

Wenn nun die heterokaryotischen Zellen in Mitose gegangen sind, ist mit dem Vorhandensein von Hybridzellen zu rechnen. Um die Eigenschaften dieser Hybridzellen studieren zu können, müssen sie zunächst isoliert und vermehrt werden. Bei der Isolierung macht man sich nun spezifische Eigenschaften der Elternzellen zunutze.

Wie schon oben erwähnt, heften sich Ehrlich-Tumorzellen sehr schwer am Kulturgefäßboden an. Folglich kann man sich ihrer entledigen, indem man durch wiederholtes Waschen der Mischkultur alle im Medium suspendierten Zellen entfernt. Um die A-9-Zellen zu eliminieren, bedient man sich ihres Enzymdefektes. Man setzt dem Medium Aminopterin, Hypoxanthin, Thymidin und Glycin in Konzentrationen von 4×10^{-4} M, 1×10^{-7} M, $1,6 \times 10^{-5}$ M und 3×10^{-6} M zu.

Aminopterin blockiert die de-novo-Synthese von Purinukleotiden und Thymidin, wozu Folsäure gebraucht wird. Zur Synthese von Folsäure ist aber das Enzym Inosinsäurepyrophosphorylase notwendig. Das Gen, für dieses Enzym ist aber durch die Behandlung der L-Zellen mit 8-Azaguanin zerstört. Folglich können in diesem Medium nur Zellen, die das Enzym selbst synthetisieren können, leben und sich des exogenen Hypoxanthins und Thymidins aus dem Medium für die Purinsynthese bedienen.

Da die Hybridzellen mit dem genetischen Material beider Elternzellen ausgestattet sind, können sie sich des Gens, das für die Synthese von Inosinsäurepyrophosphorylase kodiert, der Ehrlich-Tumorzellen bedienen und so in diesem selektiven Medium überleben.

4.3 Chromosomenpräparation

In vitro in der logarithmischen Phase wachsende Zellen werden zur Anreicherung von Mitosen mit Colcemid, dem Alkaloid von Colchicum autumnale, versetzt (Endkonzentration 2×10^{-7} M). Diese Substanz hemmt die Mitose in der Metaphase.

Nach 3–4stündiger Inkubation werden die Zellen mittels Trypsin vom Kulturgefäßboden gelöst, mit Hank's Salzlösung gewaschen und bei 1000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zu dem Zellpellet gibt man eine hypotone Lösung (1 Teil physiologisches NaCl, 4 Teile Aqua dest.) und inkubiert 10 min bei 37° C. Dabei

schwellen die Zellen durch Wasseraufnahme an und durch anschließendes Zentrifugieren werden die Chromosomen in der Zelle gestreckt und ausgebreitet. In diesem Zustand werden die Zellen 10 min lang in Eisessig : Methanol 1 : 3 fixiert.

Von dieser Zellsuspension gibt man einige Tropfen auf feuchte, eiskalte Objektträger, die bei Zimmertemperatur getrocknet werden.

Chromosomenpräparationen von Zellen solider Tumoren erhält man auf folgende Weise: Ein Stückchen Tumor wird mit einer Schere sehr fein zerschnitten, durch Gaze filtriert, um Zellklumpen zu entfernen, dann mit Colcemid zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Behandlung mit hypotoner Lösung für 20 min. Die weitere Behandlung ist die gleiche wie bei Zellkulturen.

Chromosomenpräparationen von Aszitestumorzellen erhält man, indem man den Tieren 8–10 µg Colcemid pro g Körpergewicht i.p. injiziert. Nach 6–8 Stunden wird der Aszites aus der Bauchhöhle gewonnen, mit Hank's Salzlösung gewaschen, zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes 20 min mit hypotoner Lösung inkubiert. Weitere Behandlung wie bei Zellkulturen.

Färbung der Chromosomen: Die luftgetrockneten Objektträger werden 10 min lang in eine 1 : 10 mit Aqua dest. verdünnte Giemsalösung gestellt, anschließend unter fließendem Wasser abgespült, dann luftgetrocknet und mittels Entellan und Deckglas eingedeckt.

Zur Karyotypisierung werden Metaphasenplatten unter dem Mikroskop 1000× vergrößert photographiert.

5. Ergebnisse

Die aus der Fusion von Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen mit A-9-Mausfibroblasten hervorgegangenen Hybridzellen sind innerhalb eines Zeitraumes von zwei Jahren kontinuierlich in vitro gezüchtet worden und zweimal im Abstand von 10 Monaten sowohl in vitro als auch in vivo auf ihren Malignitätsgrad getestet worden.

In vitro findet die Malignität ihren Ausdruck darin, daß solche Zellen die Fähigkeit haben, in mehrschichtigen Lagen übereinander zu wachsen, während normale Zellen immer nur in einer Zellschicht am Gefäßboden haften. Ist der zur Verfügung stehende Platz ausgefüllt, so kommt es zum Wachstumsstillstand (Kontaktinhibition).

In vivo zeigt sich der Grad der Malignität von Zellen in der Fähigkeit, nach dem Überimpfen auf histokompatible Tiere Tumoren hervorzurufen.

Da der Genotyp des ursprünglichen Tumorträgers nicht bekannt ist, wurden die in vivo-Versuche auf dem Mäusestamm der A-9-Elternzellen (C₃H) ausgeführt. Um Abstoßungsreaktionen nach dem Überimpfen der Hybridzellen zu vermeiden, wurden die C₃H-Mäuse zwei Tage nach der Geburt einer Ganzkörperbestrahlung von 400 rad ausgesetzt.

5.1 Morphologie und Wachstum der Hybridzellen in vitro

Zwei Wochen nach der Fusion von Ehrlich-Tumorzellen mit A-9-Mausfibroblasten konnten in den Kulturgefäßen zahlreiche Kolonien großer, spindel- und sternförmiger Zellen mit langen, membranartigen Protoplasmaausläufern, die am Boden hafteten, beobachtet werden.

In der logarithmischen Vermehrungsphase der Zellen in vitro beträgt die Verdoppelungszeit 12–15 Stunden.

5.1.1 Karyotyp, Markerchromosomen, Histogramm von Chromosomenzählungen

Die Hybridzellnatur dieser Zellen wurde durch karyotypologische Analysen bestätigt. Die Anwesenheit der Markerchromosomen wurde in jedem Falle nachgewiesen. Die mittlere Chromosomenzahl beträgt 89,3, die Streubreite 72–119.

Nachdem diese Hybridzellen ein Jahr in vitro gezüchtet worden waren, hat sich die mittlere Chromosomenzahl kaum verändert. Die Verdoppelungszeit dieser Zellen in vitro sank dagegen von 12–15 Stunden auf 8–10 Stunden, die Zellen hatten die Kontaktinhibition vollkommen verloren.

5.2 Überimpfen der Hybridzellen auf histokompatible Mäuse

Die in-vivo-Untersuchungen wurden nach zwei- und zwölfmonatiger Züchtung der Hybridzellen in vitro unternommen. In der ersten Untersuchungsreihe wurden 62 zwei Wochen alte, bestrahlte C₃H-Mäuse mit 0,5–2×10⁶ Hybridzellen intraperitoneal oder subcutan behandelt.

5.2.1 In einem Beobachtungszeitraum von 3 Monaten konnten bei diesen Tieren keine Hybridzellproliferationen beobachtet werden.

Nach 12monatiger Züchtung der Hybridzellen in vitro wurden 24 bestrahlte C₃H-Mäuse mit 0,5–2×10⁶ Hybridzellen behandelt. Bei 4 von diesen Tieren konnten nach 5–8 Wochen Hybridzellproliferationen festgestellt werden.

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse in vivo

Datum der Inoculation	Anzahl der Tiere	Zellart	Anzahl der inoculierten Zellen	Angehrate	Angehrate in %	Tumor nach Wochen
1. 12. 71	93	EAT	0,5–2×10 ⁶	93/0	100	2–5
15. 12. 71	52	A-9	0,5–2×10 ⁶	2/50	3,8	6–10
2. 8. 71	62	Hybridzellen	0,5–2×10 ⁶	0/62	0	./.
1. 5. 72	24	Hybridzellen	0,5–2×10 ⁶	4/24	16,6	4–8

Chromosomale Zusammensetzung der Hybridzellen

Zellart	Datum der Analyse	Anzahl ausgezählte Zellen	Mittlere Chromosomen Anzahl	Streuung	Anzahl zweiarmliger Chromosomen
Hybridzellen in vitro	5. 8. 71	42	89,3	72–119	21–26
Hybridtumorzellen in vivo	15. 8. 72	35	82,2	50–110	14–26

6. Diskussion der Ergebnisse

Der Vergleich der Angehrate von Ehrlich-Tumorzellen, A-9-Zellen und der Hybridzellen in vivo zeigt deutlich, daß sich die Hybridzellen in vivo völlig anders verhalten als die Elternzellen. Die hohe Malignität der Ehrlich-Tumorzellen hat sich nicht vererbt. Aber die geringe Angehrate der A-9-Zellen wird von den Hybridzellen nach längerer Züchtung in vitro übertroffen.

Damit ist deutlich erkenntlich, daß die A-9-Zellen einen stark supprimierenden Effekt auf die Malignität des Ehrlich-Tumorzell-Genoms in der Hybridzelle ausüben.

Chromosomenanalysen von in vivo entstandenen Tumoren bestätigen, daß diese Proliferationen tatsächlich Hybridzellproliferationen waren, erkenntlich an dem Vorhandensein der Markerchromosomen beider Elternzellen.

Um nun Aufschluß über dieses unterschiedliche Verhalten zu bekommen, wurden Chromosomenanalysen von den Hybridzellen nach unterschiedlich langer Züchtung in vitro und direkte Analysen von Hybridzellproliferationen in vivo unternommen. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß zwar die mittlere Chromosomenanzahl der Hybridzellen in vitro und in vivo nicht wesentlich differiert (89,3 / 82,2), daß aber in den Tumorzellen in vivo erheblich mehr Zellen mit einer stark reduzierten Chromosomenzahl auftreten.

Dieser Chromosomenverlust könnte nun Ausdruck dafür sein, daß es sich bei solchen Zellen um instabile Kunstprodukte handelt, die im Laufe der Züchtung in vitro und in vivo ihre Vermehrungsfähigkeit verlieren, was aber nach jahrelanger Züchtung solcher Hybridzellen in vitro und Transplantationen von Hybridzelltumoren in vivo nicht bestätigt werden konnte. Dieser Chromosomenverlust könnte aber auf die Ausbildung anomaler Chromosomenspindeln zurückzuführen sein, so daß in der Mitose einzelne Chromosomen abgestoßen werden. Dieses Phänomen gibt Anlaß zur Vermutung, daß dieser Vorgang Ausdruck eines Selektionsmechanismus ist.

Die Tumoren scheinen also nicht nur durch Proliferation der gesamten Hybridzellpopulation, sondern durch Selektion von Zellen, die Chromosomen verloren haben, hervorgerufen zu werden.

Daraus läßt sich schließen, daß bestimmte Chromosomen des A-9-Genoms für die Suppression der Malignität des EAT-Genoms verantwortlich sind. Werden diese Chromosomen abgestoßen, so kann sich die Malignität des EAT-Genoms wieder mehr durchsetzen, wie die Ergebnisse der Überimpfung der Hybridzellen nach verschieden langer Züchtung in vitro gezeigt haben. Es ist aber unwahrscheinlich, daß lediglich eine Reduktion der Chromosomenanzahl für das Wiederauftreten der Malignität verantwortlich ist.

Es scheint, daß in vivo solche Hybridzellen selektiert werden, die bestimmte Chromosomen verloren haben.

Chromosomenanalysen haben ergeben, daß vornehmlich akrozentrische Chromosomen abgestoßen werden. Da aber diese akrozentrischen Chromosomen der A-9-Zellen und der Ehrlich-Tumorzellen morphologisch nicht zu unterscheiden sind und die zweiarmigen Chromosomen der A-9-Zellen größtenteils zurückgehalten werden, kann auf diese Weise nicht festgestellt werden, welches Chromosom oder welche Gruppe von Chromosomen der A-9-Zellen für die Suppression der Malignität verantwortlich ist.

Diese Frage zu klären, wird sich an diese Untersuchungen anschließen.



Abb. 1 Metaphasenplatte und Karyotyp von Ehrlich-Lettré-Aszitestumorzellen



Abb. 2 Methaphasenplatte und Karyotyp von A-9-Zellen (Mausfibroblasten)



Abb. 3 Metaphasenplatte und Karyotyp von Hybridzellen A-9 x Ehrlich-Tumorzellen in vitro

7. Literaturverzeichnis

- BARSKI, G., S. SORIEUL and F. CORNEFERT: "Hybrid" Type Cells in Combined Cultures of Two Different Mammalian Cells Strains. *J. Nat. Cancer Inst.* 26 : 1269—1277, 1961.
- BARSKI, G. and F. CORNEFERT: Characteristics of "Hybrid"-Type Clonal Cell Lines Obtained From Mixed Cultures in Vitro. *J. Nat. Cancer Inst.* 28 : 801—816, 1962.
- DE BARY, A.: Die Mycetozoen. Ein Beitrag zur Kenntnis der niederen Tiere. *Z. wiss. Zool.* 10 : 88, 1859.
- ENDERS, J. F. and T. C. PEEBLES: Propagation in Tissue Cultures of Cytopathogenic Agents from Patients with Measles. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 86 : 277, 1954.
- FELL, H. B. and A. F. HUGHES: Mitosis in the Mouse: a Study of Living and Fixed Cells in Tissue Culture. *Quart. J. Microscop. Sc.* 90 : 355, 1949.
- HARRIS, H. and J. F. WATKINS: Hybrid Cells Derived from Mouse and Man: Artificial Heterokaryons of Mammalian Cells from Different Species. *Nature, Lond.* 205 : 640—646, 1965.
- HARRIS, H., U. BREGULA, G. KLEIN and F. WIENER: The Analysis of Malignancy by Cell Fusion. *J. Cell Sci.* 8 : 659—691, 1971.
- HARRISON, R. G.: Observations on the Living Developing Nerve Fibre. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 4 : 140, 1907.
- KRAUS, E.: Beiträge zur Riesenzellbildung in epithelialen Geweben. *Virchows Archiv path. Anat. Physiol.* 95 : 249, 1874.
- LAMBERT, R. A.: The Production of Foreign Body Giant Cells in Vitro. *J. Exp. Med.* 15 : 510, 1912.
- LEWIS, W. H.: The Formation of Giant Cells in Tissue Cultures and Their Similarity to Those in Tuberculous Lesions. *Am. Rev. Tuberc. Pulm. Dis.* 15 : 616, 1927.
- LANGHANS, T.: Über Riesenzellen mit wandständigen Kernen in Tuberkeln und die fibröse Form des Tuberkels. *Virchows Archiv path. Anat. Physiol.* 42 : 382, 1868.
- LUGINBÜHL, D.: Der Micrococcus der Variola. *Arbeiten aus dem Berner Pathologischen Institut* 2 : 159, 1871.
- LITTLEFIELD, J. W.: Selection of Hybrids from Matings of Fibroblasts in Vitro and Their Presumed Recombinants. *Science, N. b.* 145 : 709—710, 1964.
- MACKLIN, C. C.: Binucleate Cells in Tissue Culture. *Contr. Embryol.* 13 : 69, 1916, Carnegie Institute of Washington Publication 224.
- MÜLLER, J.: Über den feinen Bau und die Formen der krankhaften Geschwülste. Berlin. Zitiert bei FABER: FABER, K.: Multinucleate Cells as Phagocytes. *J. Path. Bact.* 1 : 349, 1893.
- OKADA, Y.: The fusion of Ehrlich Tumor Cells caused by H. V. J. Virus in Vitro. *Bikens J.* 1 : 103—110, 1958.
- ROKITANSKY, C.: Lehrbuch der Pathologischen Anatomie. 3. Auflage, Band I, S. 295, Braumüller, Wien, 1855.
- ROTHFELS, K. H. and L. SIMINOVITCH: An air-drying Technique for Flattening Chromosomes in Mammalian Cells grown in Vitro. *Stain. Technol.* 33 : 73—77, 1958.
- UNNA, P. G.: The Histopathology of the Diseases of the Skin. p. 637, Clay, Edinburgh, 1896.
- VIRCHOW, R.: Reizung und Reizbarkeit. *Virchows Archiv path. Anat. Physiol.* 14 : 1, 1858.
- WARTHIN, A. S.: Occurrence of Numerous Large Giant Cells in the Tonsils and Pharyngeal Mucosa in Prodromal Stage of Measles. *Archs. Path.* 11 : 864, 1931.
- VOGT, M. and R. DULBECCO: Steps in the Neoplastic Transformation of Hamster Embryo Cells by Polyoma Virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 49 : 171—179, 1963.

Mein Lebenslauf

Am 19. 4. 1942 wurde ich, **Monika** Barbara VETTERLEIN, als zweites Kind des Dipl.-Math. Richard Vetterlein und seiner Ehefrau Amalie Vetterlein, geb. Gentrup, in Hamburg geboren.

Von 1948–1953 besuchte ich die Volksschule in Wiemeringhausen (Sauerland), von 1954–1957 das Progymnasium Winterberg, von 1957–1960 das Gymnasium Uplandschule in Willingen. 1961 trat ich in das Gymnasium Schule Schloß Schwarzenberg ein und bestand dort im Juli 1964 die Reifeprüfung. Im Wintersemester 1964/65 immatrikulierte ich mich in der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die folgenden 3 Semester SS 1965–SS 1966 war ich in der Medizinischen Fakultät der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg eingeschrieben. Zum Wintersemester 1966/67 kehrte ich nach München an die Tierärztliche Fakultät zurück und beendete dort mit dem Staatsexamen im Oktober 1970 mein Studium.

Seit Dezember 1970 bin ich am Institut für Krebsforschung der Universität Wien als wissenschaftliche Assistentin tätig. Hier verfaßte ich meine Dissertation über das Thema: „Sendai-Virus indzierte Fusion von Tumorzellen mit Mausfibroblasten: Malignitätsanalyse der Hybridzellen in vitro und in vivo“, mit der ich nun an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität promovieren möchte.

Monika Vetterlein

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Dr. Dr. H. Wrba für die Betreuung meiner Arbeit und für die großzügige Bereitstellung des Untersuchungsmaterials, Frau Dr. Patricia FISCHER für ihre Beratung bei den Chromosomenanalysen und Herrn Professor Dr. E. DAHME für die freundliche Übernahme des Referates an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

München, September 1973

Monika Vetterlein

